

CHROM. 4661

Trennung von Nucleinsäurebausteinen und ihren Strukturanalogen an Sephadex G-10

Die Verwendung von Sephadex zur Trennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen wurde mehrfach in der Literatur beschrieben¹⁻⁸. Infolge reversibler Adsorption der heterocyclischen Substanzen² kommt es insbesondere an dem stark vernetzten Geltyp G-10 zu einer Retardierung, die K_D -Werte über 1 ergibt. Obwohl auf dieser Grundlage überwiegend qualitative Stofftrennungen durchgeführt wurden^{1, 2, 5, 8}, wurde der Effekt auch zur quantitativen Bestimmung von Purinen und Pyrimidinen benutzt⁴ und zur chromatographischen Strukturanalyse verwendet⁷. Da die in der Literatur publizierten Elutionskonstanten von Purin- und Pyrimidinderivaten auf Grund nicht streng vergleichbarer Versuchsbedingungen nur in begrenztem Umfange verallgemeinerungsfähige Aussagen gestatten, werden in der vorliegenden Arbeit für etwa 50 Purin- und Pyrimidinverbindungen in vergleichbarer Weise ermittelte Elutionskonstanten genannt, die unter optimalen Trennbedingungen bestimmt wurden. Im Vergleich zu bisherigen Trennungen wurde das Auflösungsvermögen des Trennvorganges erhöht. Für eine Zahl von Strukturanalogen natürlicher Pyrimidine und Purine wurden erstmals Elutionskonstanten ermittelt.

Material und Methoden

Wässrige Lösungen von Gemischen von Reinsubstanzen (50–300 µg) und Kulturmedien von *Candida guilliermondii* wurden auf einer 235 × 1.3 cm-Säule von Sephadex G-10 (normal, w_r 1.0 ± 0.1 g/g, Partikelgrösse 40–120 µ) durch Elution mit 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0, getrennt. Im Durchflussphotometer Uvicord II (LKB) wurde die Extinktion bei 254 nm bestimmt und logarithmisch registriert. Tot- und Auftragsvolumen wurden möglichst gering gehalten. Fraktionen à 4.5 ml wurden mit Hilfe eines Uvicord-Fraktionssammlers (LKB) aufgefangen. Die Peaks der Elutionskurve wurden im Unicam SP 800-Spektrophotometer ausgemessen. Als Ausschlussvolumen V_0 galt die Elutionsposition von Dextranblau. Eine konstante Durchflussgeschwindigkeit wurde durch konstanten hydrostatischen Druck aufrechterhalten. Eine Änderung dieser Grösse beeinflusst die theoretische Bodenhöhe, nicht aber die Elutionskonstante⁹.

Obwohl nach Lit. 7 und 10 ein neutrales bzw. schwach saures Elutionsmittel zu stärkerer Adsorption, grösseren Elutionsvolumina und damit zur Spreitung des Fraktogramms führt, betrachten wir die getroffene Versuchsanordnung als günstiger. Durch die Verringerung der theoretischen Bodenhöhe H bei pH 9.0 im Vergleich zu pH 7.0 erreichten wir eine bessere Trennschärfe und verhinderten eine Verdünnung. Das Auflösungsvermögen konnte durch Verlängerung der Säule erhöht werden, ohne dass zusätzliche Diffusionskräfte bei längeren Trennzeiten die Banden verbreitern. Als V_e^0 -Wert gilt die Grösse $V_e - V_0/V_0$. K_D -Werte ($V_e - V_0/V_t$) wurden wegen der unzulänglichen Bestimmungsmöglichkeit von V_t nicht errechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Innerhalb eines Trennvorganges konnten bis zu sechzehn Verbindungen quantitativ getrennt werden (Fig. 1). Das hohe Auflösungsvermögen für N-Basen, Nucleo-

side und deren Strukturanaloga erweist die reversible Adsorption als nützliches Trennprinzip für N-Heterocyclen. Es ist besonders für die Trennung von Strukturanalogen wertvoll, da diese einer papier- oder dünnsschichtchromatographischen Analyse nur schwer zugänglich sind. Die quantitative Bestimmung ist leicht möglich

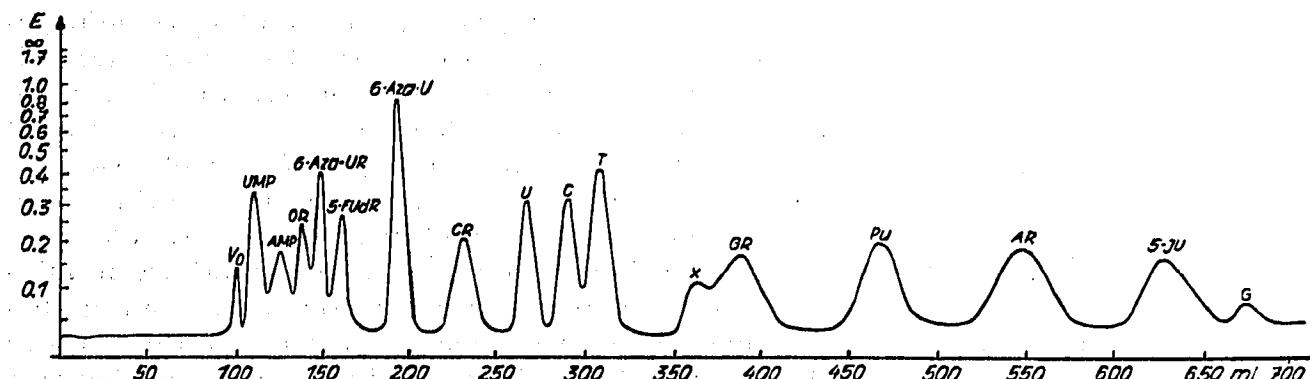


Fig. 1. Trennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen durch Adsorptionschromatographie an Sephadex G-10. Zeitbedarf der Trennung: 30 Std. Geschwindigkeit des Papiertransports im LKB-Schreiber: 10 mm/Std. Verwendete Abkürzungen: AMP = Adenosin-5'-monophosphat; AR = Adenosin; 6-Aza-U = 6-Azauracil; 6-Aza-UR = 6-Azauridin; C = Cytosin; CR = Cytidin; 5-FUDR = 5-Fluorodesoxyuridin; G = Guanin; GR = Guanosin; 5-JU = 5-Joduracil; OR = Orotidin; Pu = Purin; T = Thymin; U = Uracil; UMP = Uridin-5'-monophosphat; X = Xanthin.

durch Ausmessen des Kurveninhaltes bei linearer Registrierung der Extinktion. Für die Nucleotidanalyse muss das Verfahren infolge der höheren Molekulargewichte dieser Verbindungen unzulänglich bleiben. Nucleoside werden in gleicher Weise wie die in ihnen enthaltenen N-Basen retardiert. Demzufolge wird vorrangig am heterocyclischen Kern adsorbiert, sofern keine intramolekularen Wechselwirkungen zwischen Kernsubstituenten und der Ribose möglich sind (vgl. z.B. 5-Aminouridin). Am Gel erfolgt die Adsorption wahrscheinlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken vom heterocyclischen und Aminogruppenstickstoff zu Hydroxylgruppen und Ätherbrücken der Gelmatrix^{7,9}. Substituenten, die ein freies Elektronenpaar am N begünstigen, vergrössern die Adsorption⁷ ebenso wie eine grössere Zahl von zur Wasserstoffbrückenbindung befähigter N-Atome (Purine, Aminoverbindungen). Beispiele können der Tabelle I entnommen werden (Azaverbindungen, 5'-halogenierte Uracile u.a., vgl. unsere ausführlichere Publikation⁹). Da bei den in der Literatur beschriebenen Anwendungen der Gelfiltration zur Trennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen nicht immer vergleichbare Versuchsbedingungen angewendet wurden und auch unter Standardbedingungen das Phasenverhältnis ψ nicht exakt reproduzierbar ist, griffen wir auf die in der Papier- und Dünnschichtchromatographie häufig verwendete R_M -Wert-Beziehung zurück¹¹⁻¹³. SWEETMAN UND NYHAM⁷ konnten mit Hilfe von $\Delta \log V_e^0$ -Werten* Elutionsvolumina für Purinverbindungen voraussagen. Das gelingt uns auch für Pyrimidinderivate⁹. Mitunter entstehen aber Werteverchiebungen, da sich nicht immer ein additiver Zusammenhang der für die einzelnen Molekülteile ermittelten Werte ergibt. Die Nützlichkeit der R_M -Wert-Beziehung geht aus den in der Tabelle II aufgeführten Werten hervor. Obwohl die dort mitgeteilten $\Delta \log V_e^0$ -Werte an

* Die Grösse $\log V_e^0$ entspricht dem R_M -Wert, d.h. $\log (1/R_F - 1)$.

TABELLE I

KONSTANTEN DER GETRENNNTEN VERBINDUNGEN

	Molekular- gewicht	V_e^0	$\log V_e^0$
5'-XMP	364	0.08	-1.081
5'-IMP	348	0.09	-1.032
5'-UMP	324	0.11	-0.963
5'-CMP	323	0.13	-0.903
5'-GMP	363	0.22	-0.666
5'-AMP	347	0.22	-0.664
5'-TMP	322	0.30	-0.519
Orotidin	288	0.35	-0.452
6-Azauridin	246	0.45	-0.345
5-Fluorodesoxyuridin	246	0.55	-0.257
Pseudouridin	244	0.86	-0.066
6-Azauracil	113	0.89	-0.052
6-Azathymin	127	0.89	-0.052
Uridin	244	0.98	-0.011
5-Aminouridin	259	1.02	0.007
Orotsäure	156	1.03	0.011
2-Thiouracil	128	1.04	0.018
5-Bromdesoxyuridin	307	1.04	0.015
5-Azauracil	113	1.06	0.025
1,3-Dimethyluracil	140	1.08	0.033
5-Fluoruracil	130	1.10	0.041
Cytidin	243	1.20	0.078
Thymidin	242	1.23	0.091
Inosin	268	1.28	0.107
Barbitursäure	128	1.45	0.163
5-Diazouracil	138	1.50	0.176
Isobarbitursäure	128	1.54	0.188
Uracil	112	1.55	0.190
6-Methyluracil	126	1.73	0.238
Cytosin	111	1.77	0.248
5-Methylcytosin	125	1.79	0.253
Isocytosin	111	1.83	0.261
Thymin	126	1.92	0.283
2-Chlorpyrimidin	99	1.96	0.291
2-Methyl-4-amino-5-äthoxy-methylpyrimidin ^a	167	1.99	0.299
2-Äthyl-4-amino-5-äthoxy-methylpyrimidin ^a	181	2.17	0.337
5-Aminouracil	127	2.28	0.358
4-Methylamino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidin ^a	152	2.35	0.371
Xanthin	152	2.43	0.385
Hypoxanthin	136	2.51	0.400
2-Aminopyrimidin	97	2.59	0.414
Guanosin	283	2.60	0.416
Dimethirimol ^b	161	2.61	0.417
2'-Desoxyguanosin	267	2.80	0.447
5-Bromuracil	190	2.86	0.456
Purin	120	3.29	0.517
5-Nitouracil	157	3.33	0.522
4-Aminopyrimidin ^a	95	3.41	0.533
2'-Desoxyadenosin	251	4.05	0.608
Ethirimol ^b	161	4.38	0.641
8-Azaxanthin	153	4.50	0.653
8-Azaguanin	152	4.60	0.663
5-Joduracil	237	4.70	0.672
Adenosin	267	4.99	0.698
Guanin	151	5.11	0.708
8-Azaadenin	136	7.88	0.897
Adenin	135	8.13	0.910

^a Diese Verbindungen wurden uns freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. SCHELLENBERGER (Universität Halle) überlassen.^b Für die Überlassung dieser Substanzen danken wir Herrn Dr. SAMPSON (Brackwell, U.K.).

verschiedenen Säulen bestimmt wurden, ist der Beitrag eines Substituenten zum chromatographischen Gesamtverhalten bei unterschiedlicher Gelmenge gleich gross, da im Differenzwert $\Delta \log V_e^0$ das Phasenverhältnis ψ eliminiert wird.

TABELLE II

 $\Delta \log V_e^0$ -WERTE FÜR VERSCHIEDENE GELMENGEN

$\log V_e^0 (x) - \log V_e^0 (y) = \Delta \log V_e^0$	$\Delta \log V_e^0$		
		120 × 1.3 cm-Säule	235 × 1.3 cm-Säule
Uridin — Uracil	-0.212	-0.201	
5-Nitouracil — Uracil	+0.333	+0.338	
5-Bromuracil — Uracil	+0.269	+0.266	
Hypoxanthin — Purin	-0.120	-0.117	
Adenin — Purin	+0.387	+0.393	
6-Azauridin — 6-Azauracil	-0.283	-0.290	
6-Azauracil — Uracil	-0.243	-0.242	

Schlussfolgerungen

Die beschriebene Methode liefert schnelle und reproduzierbare Aussagen über die Anzahl und Menge von Pyrimidin- und Purinverbindungen in Gemischen biologischer oder anderer Herkunft (Fig. 2). Sie dient uns z. Zt. zur qualitativen und quantitativen Analyse von Stoffausscheidungen der flavinogenen Hefe *Candida guilliermondii*¹⁴⁻¹⁶ und zur Bestimmung von Pyrimidinanalogen. Die in den Peaks der Elutionsdiagramme enthaltenen Verbindungen können ausser durch die substanzspezifische

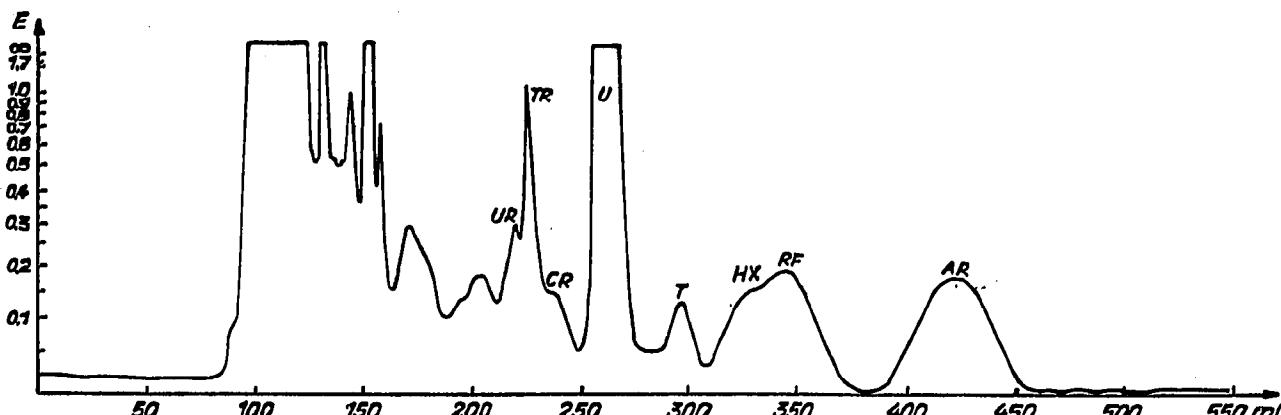


Fig. 2. Säulenchromatographische Trennung eines Kulturmediums von *Candida guilliermondii* an Sephadex G-10. Verwendete Abkürzungen: AR = Adenosin; HX = Hypoxanthin; CR = Cytidin; RF = Riboflavin; TR = Thymidin; U = Uracil; UR = Uridin; T = Thymin.

Elutionskonstante durch übliche papier- und dünnsschichtchromatographische Methoden und anhand ihrer Spektren charakterisiert und identifiziert werden. Bei entsprechender Einstellung der Registriereinrichtung können noch 5 µg Substanz quantitativ erfasst werden. Das Verfahren eignet sich in Versuchen mit radioaktiven Isotopen zur schnellen Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von Purin- und Pyrimidinverbindungen.

Für die sorgfältige Hilfe bei der Durchführung der Versuche danken wir Frau C. TEICHLER.

*Sektion Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,
Fachbereich Biochemie (Biologische Abteilung),
401 Halle/Saale (D.D.R.)*

CLAUS WASTERNACK
HORST REINBOTHE

- 1 R. BRAUN, *Biochim. Biophys. Acta*, 142 (1967) 267.
- 2 J. DE BERSAQUES, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 222.
- 3 B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.
- 4 G. GORBACH UND J. HENKE, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 225.
- 5 T. HOHN UND W. POLLMANN, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 919.
- 6 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- 7 L. SWEETMAN UND W. L. NYHAN, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 662.
- 8 S. ZADRAZIL, Z. SORMOVA UND F. SORM, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 2643.
- 9 C. WASTERNACK, *Pharmazie*, im Druck.
- 10 C. E. HEDRICK UND G. McDougall, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 345.
- 11 M. BRENNER, A. NIEDERWASSER, G. PATAKI UND R. WEBER, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 79.
- 12 L. NOVER, G. JÜTTNER, S. NOACK, G. BAUMGARTEN UND M. LUCKNER, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 419.
- 13 L. NOVER, G. BAUMGARTEN UND M. LUCKNER, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 450.
- 14 D. SCHLEE, H. REINBOTHE UND W. FRITSCHE, *Z. Allg. Mikrobiol.*, 8 (1968) 127.
- 15 K. ZUR NIEDEN, W. FRITSCHE, D. SCHLEE UND H. REINBOTHE, *Acta Biol. Med. Ger.*, 23 (1969) 235.
- 16 D. SCHLEE UND H. REINBOTHE, *Z. Allg. Mikrobiol.*, 10 (1970) 77.

Ein gegangen am 13. Februar 1970

J. Chromatog., 48 (1970) 551-555

CHROM. 4643

Autoradiography of thin-layer radiochromatograms using Polaroid film

Autoradiography of thin-layer radiochromatograms has commonly been performed by exposure of the radiochromatogram to X-ray film in a photographic darkroom for various periods followed by development of the film with a suitable developer. This procedure requires the space for the photographic darkroom and the tedious use of wet-process developers. Radiochromatographic scanners and cameras have recently been employed as an alternate method for the detection of labeled compounds on TLC plates, but price restrictions discourage many investigators from using this technique. It was, therefore, desirable to devise an autoradiographic procedure which would be both inexpensive and uncomplicated and would not require a darkroom or a wet-process development. Incorporation of Polaroid film, as noted in a previous report¹, and a suitable exposure cassette into the autoradiographic process proved to be an excellent technique which may be used by investigators who desire an inexpensive, uncomplicated autoradiographic procedure. The procurement of a positive